第8卷 第1期
1987年2月

动 物 学 研 究
ZOOLOGICAL RESEARCH

Vol.8, No. 1
Feb, 1987

鸟类羽髓细胞培养方法的建立及其细胞增殖动力学研究*

朱魁天**　吕 群　项 维

（复旦大学遗传学研究所 上海）

摘　要

采用常规的外周血培养技术很难获得足够分析的鸟类细胞中期染色体标本。目前为止，对于鸟类的细胞遗传学研究仍采用骨髓制备染色体的方法，但这种方法不能用于对一些稀有珍禽的研究。

为研究鸟类细胞遗传学，我们建立了鸟类羽髓细胞离体短期培养的方法。应用这种方法，经48小时培养就可收获细胞并制备染色体标本。同时，还应用姐妹染色单体差别染色技术（ＳＣＤ），对羽髓细胞的增殖周期进行了研究并取得成功。

实验表明，我们所建立的鸟类羽髓细胞培养方法具有：（１）取材容易，（２）增殖迅速，（３）操作简便的特点。

关键词　羽髓　鸟类细胞遗传学　姐妹染色单体分化染色体技术　鸟类性别鉴定

近年来，由于外周血淋巴细胞培养技术的建立和广泛应用，促进了动物细胞遗传学研究的不断发展。以哺乳动物为例，已经研究并报道的种类约占现存种类的30%。但与之相比，有关鸟类的细胞遗传学研究无论在深度上、广度上均存在较大差距。据报道，目前已经研究的鸟类仅占现存种类的４%左右。造成这种差异的主要原因之一是，低渗法很难破坏鸟类外周血中的有核红细胞，而且血液中有较强的凝血因子。因而应用常规淋巴细胞培养技术，很难制备出数量足够的、可供分析的染色体标本。目前，相当部分的工作仍采用骨髓制片法，但这不适用于对稀有珍禽的研究。

---

*　本工作得到刘祖洞教授和赵元寿副教授的关心指导；周自强同志参加部分工作；陈金清、叶楠同志提供实验用种鸡，谨致谢意。

**　安徽大学生物系进修教师，现在安徽大学生物系遗传教研室。

本文1985年12月４日收到，1986年３月17日收到修改稿。

为了寻找一种较为理想的鸟类细胞学研究方法，Sasaki 等曾报道培养羽髓组织以制备染色体的技术，但因周期太长（培养十天才能收获细胞）而未能推广应用。鉴于上述情况，作者经过反复摸索，建立了一种简便快速且可获得高质量染色体的羽髓细胞离体短期培养方法。与Sasaki等的工作相比，本方法的主要特点是：（1）采用适当的胶原酶处理羽髓组织，（2）提高培养温度，（3）短时间的秋水仙素处理。应用这种方法，48小时左右即可收获细胞、制片。并在此基础上，运用5—溴脱氧尿苷（Brd U）参入标记技术制备出姐妹染色单体差别染色（SCD）的染色体。对鸟类羽髓中成纤维样细胞的增殖动力学作了初步研究，取得了比较满意的结果。

材料与方法

（一）实验动物：莱亨种鸡（Leghorn，S—220品系。2♀，1♂），四月龄，体重平均800克左右。取自上海生物制品所。

（二）细胞培养及染色体制备：　原代培养　在实验鸡翅膀上选择初级或次级飞羽3—4根，用75%酒精作局部消毒。拔取羽毛，随即用手术剪剪下羽毛基部置于灭菌平皿中。在无菌条件下，用解剖刀纵剖羽杆。剔取其中的羽髓组织于凹面玻片上。加少许灭菌生理盐水洗涤数次以除去少量红细胞。将组织块移入灭菌小瓶中，用眼科剪剪碎。然后加入2 ml胶原酶溶液（上海医工院产品，最终浓度30单位/毫升）。用滴管将此组织悬液移至离心管中，37°C水溶消化10—20分钟。加入2 ml1640培养液（内含小牛血清20%，青、链霉素各100单位/毫升，pH7.0—7.2）以终止酶的作用，因为小牛血清可以终止酶的活性。离心，弃上清液。加入少量1640培养液，用滴管将沉淀物吸入培养瓶中，轻轻摇动，使培养物均匀分布于瓶底。最后加2—4 ml培养液，置40°C温箱培养24小时。

传代培养　以0.25%胰酶（Difco 1:250）消化贴壁生长的细胞，加入2—4ml培养液使之成为细胞悬浮液，接种于培养瓶中（浓度为60万细胞/毫升）。继续培养24小时。当培养瓶中70—80%细胞汇合并出现许多圆形正处在分裂时期的细胞时即可收获细胞，也可继续传代培养。

染色体制片　收获细胞前2—3小时加入秋水仙素（最终浓度为0.2μg/ml）。0.25%胰酶消化后，0.54%kcl溶液于37°C水溶中低渗处理20—30分钟。甲醇、冰醋酸（3：1）反复固定离心3次。气干法制片。

（三）姐妹染色单体差别染色法（SCD）**处理**：当原代培养细胞经传代并完全贴壁时，加BrdU溶液于培养物中（最终浓度为15μg/ml），进入暗培养，并由此开始计时，分别于24、28、36、40小时收获细胞、制片。所得染色体玻片置室温过夜。次日，紫外灯照光，分化染色。显微镜下计数色差百分比。

结果和讨论

（1）关于鸟类羽髓细胞培养方法的可行性： 实验结果表明，以鸟类羽髓细胞为材料作离体短期培养的方法具有如下优点：

取材容易 我们的工作表明，从小至2周龄的雏鸡到4月龄成鸡，均能从飞羽中得到丰富羽髓组织。由于鸟类飞羽具有相当的再生能力，从被拔取羽毛的毛孔中能很快地再生出新的羽毛。因此，用同一个体可以反复取样培养，无损于个体成活。

增殖迅速 实验表明，只要所采羽毛的羽髓组织处于旺盛的增殖期，原代培养4—5小时后，从组织块边缘呈放射状地长出梭形细胞。10小时后就可长成小片单层细胞（见图1）。一般条件下，原代培养经48小时即可收获细胞。

操作简便 羽髓细胞培养无需特殊设备和条件，操作程序简单，在一般具有无菌操作条件的实验室中均可进行。有利于推广应用。

（2）关于离体培养条件下羽髓细胞的增殖动力学： 在DNA复制过程中，BrdU作为核苷酸前体参入新合成的DNA链中胸苷的位置，故细胞在含有BrdU的培养液中经历两次细胞分裂周期后，即可产生DNA组成有差异的两条姐妹染色单体：一条单体的DNA双链分别含有BrdU和不含BrdU，另一条单体则双链均含BrdU。经SCD技术处理后产生色差明显的染色单体，以此可作为鉴别细胞周期的特殊标记。应用这一原理及SCD技术，我们初步测定了Leghorn S—220品系的羽髓细胞的增殖周期，结果见表1。

表1 羽髓细胞SCD出现频率

Table 1. SCD frequency of feather pulp cells

培养时间 Culture Time (小时) hr	镜检分裂相总数 Number of Metaphase Examined	第一次分裂周期 First Cycle		第二次分裂周期 Second Cycle		第三次分裂周期 Third cycle	
		细胞数 Cell Number	%	细胞数 Cell Number	%	细胞数 Cell Number	%
24	50	49	98	1	2	0	0
28	50	29	58	21	42	0	0
36	50	25	50	16	32	9	18
40	50	34	68	10	20	6	12

由表1可见，24小时收获的细胞98%仍处于第一周期，无色差出现（见图2）。仅有2%的细胞有色差，可见24小时似乎是细胞从第一周期向第二周期过渡的临界时间。培养至28小时收获的细胞，有色差的分裂相已占42%，达到第二周期细胞数的高峰（见图3）。在36和40小时分别取样时，除了有第一、第二周期细胞外，还有第三周期细胞的出现。因此，可以推测，12—14小时可能是这种细胞在培养条件下的细胞增殖周期。

（3）关于羽髓细胞培养方法的几个技术关键： 经反复摸索，我们认为下列几个环节对于实验成功是至关重要的：

胶原酶处理　因为羽髓组织中含有大量胶原组织，只有经酶消化后，其中的成纤维细胞才能暴露于培养液中，或游离在瓶底贴壁生长，本实验采用上海医工院生产的胶原酶，最适处理浓度为30单位/毫升，酶处理时间应视羽髓总量、胶原化程度而定，一般我们采用的时间为37°C中10—20分钟。

培养液的pH　羽髓细胞生长的最适pH值为7.0—7.2。由于羽髓细胞具有快速生长的特性，培养液中的营养成分很易被消耗，pH值降低，其特征是培养液颜色变黄。此时必须更换新鲜培养液，以维持细胞生长，一般每隔一天换一次培养液。

秋水仙素浓度与处理时间　鸟类染色体对秋水仙素比较敏感，为得到形态细长的染色体，需严格控制秋水仙素的浓度和处理时间。本实验所用的秋水仙素浓度为0.2 μg/ml，处理时间为2—3小时。

建立羽髓细胞培养方法，为鸟类细胞遗传学、鸟类性别的快速鉴别，以及从染色体水平探索鸟类进化和分类学问题提供了有效手段；对于一些稀有珍禽的生物学研究更具有重要意义。

参 考 文 献

吕群、江绍慧等 1981 小鼠活体精原细胞姐妹染色单体互换测定。科学通报（21）：1327—1329

吴旻、王秀琴 1979 正常人和放射工作人员淋巴细胞在培养条件下的姊妹染色单体互换和染色体的畸变。实验生物学报（12）：31—36。

De Boer, L. E. M. and Vau Brink, J. M. 1982 Cytotaxonomy of the Ciconiiformes (Aves), With Karyotypes of Eight Species New to Cytology. Cytogenet, *Cell Genet*, 34: 19—34

Mengden, G. A. and Stock, A.D. 1975 A preliminary report on the application of current cytological techniques to sexing birds. *Husbandry*, 138—141

Sasaki, M., Ikeuchi, T., Makino, S., 1968 A feather pulp culture technique for avian chromosomes With notes on the chromosomes of the Peafowl and the Ostrich. *Experientia*, 24:1292—1293

Stock, A. D. and Bunch, T. D., 1982 The evolutionary implications of chromosome banding pattern homologies in the bird order Galliformes. Cytogenet, *Cell Genet*. 34: 136—148

Takagi, N. Iton, M. and Sasaki, M. 1972 Chromosome study in four species of Ratitae (Aves). *Chromosoma(Berl)* 36: 281—291

ESTABLISHMENT OF AVIAN FEATHER PULP CULTURE METHOD AND STUDY ON THE CELL DIVISION

Zhu Sutiau* Lu Qun | Xiang Wei |

(Institute of Genetics, Fudan University Shanghai)

It is difficult to obtain enough metaphase chromosomes for avian cytogenetic analysis by conventional peripheral blood culture technique. Up to now, the bone marrow technique is applied in a few of avian studies. But this technique can not be used for conservation.

This paper reported a short-term feather pulp cell-culture in vitro. Using this method, the cell cultured can be harvested and the chromosome prepared within 48 hr. At the same time, using the sister chromatid differential staining (SCD) method, we successfully studied the feather pulp cell division cycle.

Experimental results showed that the avian feather pulp culture method is reliable and has several advantages: 1) It is easier to obtain the experimental materials and will not hurt the bird tested. 2) The cell division rate is rather high. 3) The technique is quite simple.

The method is as follows:

1. Two or three primary-flying feathers were selected and removed from the bird. The pulp-tissues were scraped into a depression slide.

2. The pulp was minced as finely as possible before transferred to small glass bottle. Collagenase was added to become a final concentration of 30μg/ml and left for 10—20 mins. at 37°C, then thecollagenase was quenched with 2ml of medium containing 20% FCS.

3. Suspension containing the pulp cells was distributed to the bottom of flask and incubated at 40°C.

4. After incubated for 24 hr, cell suspension containing at least 6×10^5 cells/ml was subcultured for another 24 hr. Chromosome preparation was made routinely by air-drying method.

* Present address, Department of Biology, Anhui University, Hefei, China.

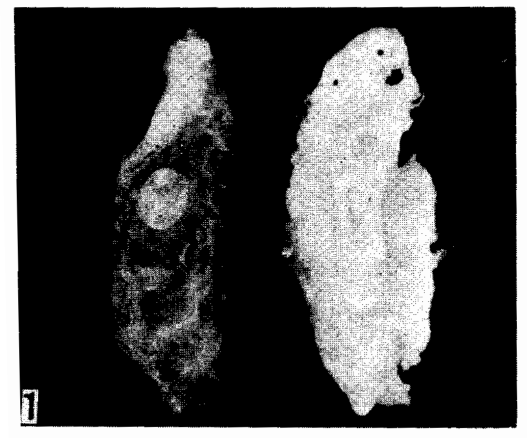
5. The treatment of SCD technique: BrdU solution was added into cultures (15μg/ml), then, chromosome preparation was made at 24, 28, 36, 48 hr. separately. Before staining with Giemsa the slides were exposed to U.V.light. The percentage of chromosome with SCD was counted.

Key words: Feather pulp Avian cytogenetics SCD technique The sex determination of birds

Zhu Sutian *et al*: Establishment of avian feather pulp culture method and study on the cell division

Fig. 1 The cells grow out-migration from small feather pulp tissue. Fig. 2 The first cycle metaphase haevested in 24 hr. Fig. 3 The second cycle metaphase. shown SCD. Fig. 4 The third cycle metaphase. shown a part of SCD.

Wei Qi *et al*.: Histochemical localization of γ-Glutamyl transpeptidase in the venom Glands of two species snakes from two families





图（1）中华眼镜蛇毒腺大体标本γ—GT染色　左：为γ—GT酶染色　右：为煮沸灭活的对照

图（2）蝰蛇毒腺大体标本γ—GT染色　左：为γ—GT酶染色　右：为煮沸灭活的对照